Występowanie izoflawonów w krajowych gatunkach koniczyny

MARIAN JURZYSTA, STANISŁAW BURDA, JANUSZ ŻUREK, MICHAŁ PŁOSZYŃSKI

Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin Uprawnych, Instytut Uprawy Nawożenia
i Gleboznawstwa, Osada Pałacowa, 24-100 Puławy

(Otrzymano dn. 29.09.1987)

M. Jurzysta, S. Burda, J. Żurek, M. Płoszyński (*Department of Biochemistry and Crop Quality, Institute of Soil Science and Plant Cultivation, 24-100 Puławy, Poland*) *Acta Agrobotanica* 41(1): 77-90 1988.

The occurrence of isoflavones in some domestic clover varieties

Abstract

Preliminary investigations were carried out in order to ascertain the occurrence of isoflavonoid compounds characterized by estrogenic activity, in five domestic species of clover: *Trifolium pratense* L., *T. repens* L., *T. incarnatum* L., *T. resupinatum* L. and *T. hybridum* L. Large amounts of biochanin A (0.8% d.m.) and formononetin (0.7% d.m.) and small amounts of genistein were identified in the green parts of red clover. In the remaining species, small amounts of formononetin and genistein were found. In all the species of clover, free isoflavonoid aglycones and glycosides were found. Laboratory tests carried out on mice showed that only *T. pratense* contained high estrogen activity. Red clover also had an unidentified factor which inhibited the increase of the body weight of young mice.

WSTĘP

W roku 1946 ukazała się publikacja (Bennetts i in., 1946) na temat estrogennych właściwości koniczyny podziemnej (*Trifolium subterraneum* L.), gdzie po raz pierwszy podano rozpoznanie przyczyny bezpłodności owiec wypasanych na terenach Australii. Od tej pory opublikowano wiele prac naukowych i przeglądowych (Liener, 1969) na temat występowania substancji estrogennych w różnych roślinach pastewnych. Powszechnie przeważa pogląd, że za właściwości estrogenne pasz odpowiedzialne są przede wszystkim izoflawony i kumestrol. Izoflawony wykazują wprawdzie znacznie słabsze właściwości estrogenne w porównaniu z kumestrolem, jednak występują one w niektórych gatunkach koniczyny w bardzo dużych ilościach, sięgających niekiedy kilku procent suchej masy (Beck, 1964).

Najczęściej spotykanymi izoflawonami koniczyn są: biochanina A (5,7-dihydroksy-4'-metoksyizoflawon), formononetyna (7-hydroksy-4'-metoksyizoflawon), genisteina (5,4',7-trihydroksyizoflawon) oraz daidzeina (7,4'-dihydroksyizoflawon) i pratenseina (3',5,7-trihydroksy-4'-metoksyizoflawon). W literaturze światowej ukazało się dotychczas wiele publikacji na temat występowania izoflawonów w rodzaju *Trifolium*, ich składu chemicznego, biosyntezy oraz wpływu różnych czynników genetycznych i środowiskowych na kształtowanie się ich zawartości (Wong, 1975). Powszechność uprawy w Polsce koniczyny oraz brak w piśmiennictwie krajowym jakichkolwiek prac w tym zakresie skłonił autorów do podjęcia wstępnych badań nad występowaniem związków estrogennych typu izoflawonów w uprawianych w kraju gatunkach koniczyny.

MATERIAŁ I METODY

Badano pięć gatunków koniczyny: koniczynę białą (*Trifolium repens* L. odm. Radzikowska), koniczynę czerwoną (*T. pratense* L. odm. Hruszowska), inkarnatkę (*T. incarnatum* L. odm. Opolska), koniczynę perską (*T. resupinatum* L.) i koniczynę szwedzką (*T. hybridum* L. odm. Zorza). Nasiona koniczyny wysiewano wiosną 1983 r. na polu Zakładu Doświadczalnego IUNG, Kępa. Rośliny rosły na madzie średniej zawierającej 36⁰/₀ części spławialnych, 19,0 mg przyswajalnego P₂O₅ i 15,5 mg K₂O na 100 mg gleby oraz 2,5⁰/₀ próchnicy i pH (KCl) 6,2. Rośliny odchwaszczano ręcznie. Materiał do badań (części nadziemne) uzyskano przez wysuszenie w 60°C roślin ściętych w początkach kwitnienia, w drugim pokosie w pierwszym roku użytkowania.

Izoflawonoidy ekstrahowano wyczerpująco wrzącym etanolem z 10 g próbek zmielonego suszu. Połączone ekstrakty odparowywano do sucha i pozostałość zawieszano w 10 ml wody. Wolne izoflawony ekstrahowano z roztworu wodnego chloroformem, a glikozydy flawonoidowe octanem etylu. Glikozydy, po odparowaniu octanu etylu, hydrolizowano przez ogrzewanie do wrzenia pod chłodnicą zwrotną przez 2 godziny w 10 ml mieszaniny 4 N HCl i metanolu (1:1). Hydrolizat rozcieńczono dwukrotnie wodą i po oddestylowaniu alkoholu ekstrahowano wolne izoflawony chloroformem.

Glikozydy flawonoidowe rozdzielano techniką dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej na płytkach (20 × 20 cm) pokrytych 0,1 mm warstwą celulozy (firmy Merck). Do rozwijania chromatogramów stosowano 15⁰/₀ kwas octowy (S1) oraz mieszaninę: n-butanol – kwas octowy – woda (4:1:5 v:v:v), faza górna (S2). Do rozdzielania wolnych izoflawonów stosowano chromatografię cienkowarstwową na żelu krzemionkowym (Kieselgel 60 F₂₅₄ – Merck) w układach benzen – metanol (9:1 v:v) (S3), chloroform – metanol (89:11 v:v) (S4) i chloroform – kwas octowy (85:15 v:v) (S5). Chromatogramy oglądano w świetle UV (254 i 366 nm) po uprzedniej ekspozycji w parach amoniaku.

Zawartość izoflawonów w badanych gatunkach oznaczano ilościową metodą chromatograficzną. 100 mg zmielonego suszu koniczyzny zalewano, w kolbce miarowej na 10 ml, 3 ml wody destylowanej. Po upływie 1 godziny kolbkę dopełniano do kreski etanolem i pozostawiano na dalsze 2 godziny, od czasu do czasu wstrząsając. Roztwór наносzono na płytki do chromatografii cienkowarstwowej w ilościach 10, 20 i 40 mikrolitrów obok wzorcowych roztworów formononetyny, biochaniny A i genisteiny (0,05-1,00 µg/ml). Stężenie poszczególnych izoflawonów w próbkach oceniano na podstawie porównania wielkości ich plam widocznych na chromatogramach w świetle UV z plamami odpowiednich wzorców.

Do doświadczeń żywieniowych użyto albinotycznych myszy laboratoryjnych z hodowli własnej. Trzytygodniowe samice o masie ciała około 13 g umieszczono w osobnych klatkach i podawano im przez 10 dni paszę i wodę ad libitum. Myszy ważono przed rozpoczęciem i po zakończeniu doświadczenia. Jedenastego dnia myszy uśpiono i określono masę wypreparowanych i osuszonych bibułą macic. Spożycie paszy określano indywidualnie dla każdej myszy uwzględniając masę niewyjadów. Doświadczenie prowadzono w ośmiu powtórzeniach dla każdego obiektu. Diety doświadczalne przygotowano przez dodanie do zmielonej paszy standardowej „Murigran” (producent — Zakład Doświadczalny CLPP — Wytwórnia Pasz w Motyczu) zagęszczonych ekstraktów etanolowych z suszu badanych gatunków koniczyzny. Po starannym wymieszaniu ekstraktu z paszą alkohol odparowywano w 60°C, a różnice wagowe diet powstałe w wyniku dodania różnych ilości ekstraktów korygowano przez dodatek odpowiedniej ilości wody. Udział ekstraktu z koniczyzny w diecie podano na wykresach i w tabeli jako równoważnik ilości koniczyzny w diecie, to jest stosunek wagowy ilości suszu, z której przygotowano ekstrakt, do ilości paszy standardowej.

WYNIKI

Wstępna analiza chromatograficzna wykazała obecność w ekstrakcie z nadziemnych części badanych gatunków koniczyzny zarówno wolnych izoflawonów, jak również ich glikozydów. W dalszym toku analizy rozdzielono te obie formy izoflawonów wykorzystując różnice w ich polarności. Analiza chromatograficzna frakcji chloroformowej wykazała obecność wolnych izoflawonów takich jak: biochanina A, formononetyna i genisteina (tab. 1), których udział i zawartość w poszczególnych gatunkach koniczyzny były różne (tab. 2). Najwyższą zawartością wolnych izoflawonów charakteryzowała się koniczyzna czerwona. W jej ekstraktach stwierdzono biochaninę A i formononetynę oraz znacznie mniejsze ilości genisteiny. Żaden z pozostałych gatunków koniczyzny nie zawierał wykrywalnych ilości biochaniny A, natomiast formononetyna i genisteina były obecne w niewielkich ilościach. W ekstrakcie z koniczyzny białej i szwedzkiej stwierdzono na chromatogramach obecność

dwu dodatkowych plam fluoryzujących intensywnie niebiesko w świetle UV przy 366 nm. W układach rozwijających powszechnie używanych do rozdzielania izoflawonów koniczyny, oba te składniki miały współczynniki R_f niemal identyczne z wartościami R_f biochaniny i formononetyny. Po wypróbowaniu szeregu układów rozwijających stwierdzono, że wszystkie analizowane komponenty rozdzielają się dobrze w mieszaninie chloroform – kwas octowy (85:15 v:v). Układ ten był w dalszej części pracy stosowany do półilościowego oszacowania zawartości izoflawonów w materiale roślinnym.

Fracje glikozydowe z ekstraktów analizowano techniką dwukierunkowej chromatografii cienkowarstwowej (tab. 3). Z uwagi na dużą liczebność komponentów glikozydowych zrezygnowano z izolacji poszczególnych składników, a frakcję glikozydową poddano hydrolizie kwasowej. Uzyskane w wyniku hydrolizy aglikony analizowano chromatograficznie na obecność izoflawonów (tab. 2). Wykazano (tab. 2), że we wszystkich analizowanych gatunkach koniczyny izoflawony występują zarówno w stanie wolnym, jak też w formie glikozydowej, co skłoniło nas do zastosowania hydrolizy enzymatycznej przed ilościowym ich oznaczaniem. Hydrolizę autoenzymatyczną i ekstrakcję izoflawonów przeprowadzono według rutynowej metody opracowanej przez Gosdena i Jonesa (1978) dla oznaczeń formononetyny wprowadzając tylko niewielkie modyfikacje. Oszacowania zawartości izoflawonów dokonano za pomocą chromatografii cienkowarstwowej, porównując bezpośrednio plamy poszczególnych izoflawonów na chromatogramie z plamami odpowiednich wzorców. Plamy biochaniny A i genisteiny obserwowano w świetle UV przy 254 nm wykorzystując ich zdolność do wygaszania fluorescencji indykatora, a plamy formononetyny przy 366 nm, po uprzedniej ekspozycji chromatogramów w parach amoniaku. Jak wykazano w tabeli 4, jedynie koniczyna czerwona jest bogata w izoflawony. Pozostałe koniczyny są ubogie w te składniki, a ogólna ich zawartość nie przekracza 0,1%.

Oceny aktywności estrogennej badanych gatunków dokonano na podstawie zmian stosunku masy macicy do masy ciała myszy karmionych dietą z dodatkiem ekstraktów alkoholowych z suszu analizowanych koniczyn. Przeprowadzone doświadczenia żywieniowe wykazały wysoką aktywność estrogeną koniczyny czerwonej. Jak wynika z wykresu (rys. 1) wraz ze wzrostem równoważnika ilości koniczyny w diecie, liniowo wzrastał wskaźnik aktywności estrogennej. U myszy karmionych paszą o zawartości ekstraktu takiej jaką ma susz koniczyny czerwonej (równoważnik ilości koniczyny równy 1), stosunek masy macicy do masy ciała był około pięciokrotnie wyższy niż u myszy karmionych paszą kontrolną.

W celu porównania aktywności estrogennej analizowanych gatunków koniczyny wykonano doświadczenie żywieniowe z dietami o takim samym równoważniku ilości koniczyny. Dane tabeli 5 wskazują, że przy równoważniku ilości koniczyny wynoszącym 0,3, tylko koniczyna czerwona wykazała

Tabela 1 — Table 1

Charakterystyka chromatograficzna izoflawonów koniczyny
Chromatographic characteristics of clover isoflavones

Składnik Component	Wartości R_f w układzie R_f value in solvent system			Barwa plam w świetle UV Color of spots in UV		
	S3	S4	S5	UV 254	UV 336	UV 366/NH ₃
Biochanina A Biochanin A	0,52	0,78	0,66	brunatna brown	—	—
Formononetyna Formononetin	0,33	0,70	0,49	szaroniebieska grey-blue	bladoniebieska light-blue	zieloniebieska green-blue
Genisteina Genistein	0,18	0,51	0,27	brunatna brown	—	—
Składnik N ₁ Component N ₁	0,26	0,70	0,59	—	niebieska blue	bladoniebieska light-blue
Składnik N ₂ Component N ₂	0,34	0,79	0,44	—	niebieska blue	niebieska (intens.) dark blue

Tabela 2 — Table 2

Występowanie wolnych i związanych glikozydowo izoflawonów w koniczynie
Occurrence of free and bound glycoside isoflavones in clover

Składnik Component	Względna zawartość składnika Relative content of component				
	koniczyna biała White clover	koniczyna czerwona Red clover	inkarnatka Crimson clover	koniczyna perska Persian clover	koniczyna szwedzka Alsike clover
Biochanina A a	—	+++++	—	—	—
Biochanin A b	—	+++++	—	—	—
Formononetyna a	+	+++++	++	++	+
Formononetin b	+	+++++	++	++	+
Genisteina a	+	++	+	++	++
Genistein b	+	+	+	+	+
Składnik N ₁ a	+++++	—	—	—	+++++
Component N ₁ b	+++++	—	—	—	+++++
Składnik N ₂ a	+++++	—	—	—	+++++
Component N ₂ b	+++++	—	—	—	+++++

a — izoflawony wolne, free isoflavons; b — izoflawony związane glikozydowo, isoflavones glycoside bond.

właściwości estrogenne, powodując ponad trzykrotny przyrost stosunku masy macicy do masy ciała myszy w porównaniu z dietą kontrolną, pozostałe gatunki koniczyny nie spowodowały istotnych zmian tego stosunku, co wskazuje na brak aktywności estrogennej.

W przypadku wszystkich badanych gatunków dodatek ekstraktu do paszy standardowej powodował spadek spożycia diety przez zwierzęta doświadczalne w granicach 20-30% (tab. 5). Spadek ten nie jest skorelowany z działaniem estrogennym ani z oznaczoną chromatograficznie zawartością izoflawonów.

W doświadczeniach żywieniowych obserwowano również różnice w przyrostach masy ciała myszy. Jeżeli dla uniknięcia wpływu różnych ilości przyjętego pokarmu porównuje się przyrost masy ciała na jednostkę spożytej paszy, to daje się zauważyć niższe przyrosty zwierząt w przypadku koniczyny czerwonej zarówno w porównaniu z dietą kontrolną, jak i w porównaniu z pozostałymi badanymi gatunkami z rodzaju *Trifolium* (tab. 5). Hamujące działanie ekstraktów z koniczyny czerwonej na wzrost zwierząt doświadczalnych szczególnie silnie ujawniło się w przypadku zwiększenia ich udziału w diecie (rys. 2). Zwierzęta otrzymujące paszę wzbogaconą w ekstrakt w ilości odpowiadającej równoważnej ilości koniczyny nie tylko nie przybierały na wadze, ale masa ich ciała po dziesięciu dniach spadła poniżej wyjściowej.

Tabela 3 — Table 3

Charakterystyka chromatograficzna frakcji glikozydowych ekstraktów z pięciu gatunków koniczyzny

Chromatographic characteristic glycoside fractions of the extracts from five clover species

Gatunek Species	R _f		Barwa plam w UV Color of spots in UV		
	S1	S2	UV 254	UV 366	UV 366/NH ₃
1	2	3	4	5	6
Koniczyna biała	0,47	0,47	br	br	sz-ż
White clover	0,67	0,61	nb	nb	nb
	0,56	0,88	b-nb	b-nb	b-nb
	0,31	0,76	b-nb	b-nb	b-nb
	0,22	0,56	br	br	sz-ż
	0,52	0,68	b-ż-z	—	—
	0,59	0,77	—	—	b-z
	0,38	0,54	—	—	b-z
	0,11	0,48	—	—	b-z
	0,02	0,32	—	—	b-z
	0,13	0,40	—	—	sz-ż
Koniczyna czerwona	0,63	0,78	nb-f	nb-f	b-nb
Red clover	0,51	0,72	nb-f	nb-f	b-nb
	0,44	0,74	nb-f	nb-f	b-nb
	0,33	0,77	nb-f	nb-f	b-nb
	0,60	0,63	b-nb	b-ż-z	sz-ż
	0,34	0,49	br	br	sz-ż
	0,07	0,20	b-ż	b-ż	—
	0,50	0,52	br	—	—
	0,55	0,71	br	—	—
	0,61	0,57	—	—	j-f
	0,74	0,77	—	—	b-z
	0,72	0,92	—	—	b-z
	0,70	0,87	—	—	j-f
	0,54	0,85	—	—	b-nb
	0,67	0,45	—	—	b-ż
	0,29	0,49	—	—	ż
Inkarnatka	0,57	0,90	b-nb	b-nb	—
Crimson clover	0,48	0,71	b-nb	b-nb	b-z
	0,48	0,60	b-bn	b-nb	b-z
	0,40	0,48	b-nb	b-nb	b-z
	0,29	0,40	br	br	br
	0,30	0,53	br	br	br
	0,10	0,31	br	br	ż
	0,12	0,43	br	br	br
	0,55	0,61	b-nb	—	—
	0,60	0,37	—	—	j-f
	0,56	0,56	—	—	j-f
	0,36	0,93	—	—	j-f
	0,25	0,91	—	—	b-nb
	0,06	0,86	—	—	b-nb
	0,11	0,35	—	—	b-nb

c.d. Tabeli 3

1	2	3	4	5	6
Koniczyna perska	0,46	0,77	br	br	b-br
Persian clover	0,38	0,65	br	br	b-br
	0,29	0,54	br	br	sz-ż
	0,58	0,76	nb-f	nb-f	b-nb
	0,26	0,74	nb-f	nb-f	nb
	0,53	0,65	b-nb	—	—
	0,69	0,74	—	—	b-nb
	0,65	0,84	—	—	b-nb
Koniczyna szwedzka	0,72	0,60	nb-f	nb-f	nb-f
Alsike clover	0,39	0,73	nb-f	nb-f	b-nb
	0,26	0,75	nb-f	nb-f	nb-f
	0,25	0,52	br	br	br
	0,55	0,63	b-ż-z	—	—
	0,58	0,28	—	—	nb
	0,54	0,91	—	—	nb
	0,45	0,71	—	—	j-z
	0,15	0,46	—	—	j-z
	0,01	0,66	—	—	j-z

Barwa plam (color of spots):

br — brunatna (brown),

nb — niebieska (blue),

ż — żółta (yellow),

z — zielona (green),

sz — szara (grey),

f — fiołkowa (violet),

b — blada (pale),

j — jasna (light),

j-f — fiołkowa (light-violet).

Tabela 4 — Table 4

Zawartość izoflawonów w badanych gatunkach koniczyny

The content of isoflavones in the studied species of clover

Gatunek Species	Zawartość izoflawonów w % s.m. Content of isoflavones in % d.m.			
	biochanina A biochanin A	formononetyna formononetin	genisteina genistein	suma total
Koniczyna biała White clover	—	0,02	0,03	0,05
Koniczyna czerwona Red clover	0,80	0,70	0,07	1,57
Inkatrnatka Crimson clover	—	0,03	0,04	0,07
Koniczyna perska Persian clover	—	0,07	0,02	0,09
Koniczyna szwedzka Alsike clover	—	0,02	0,08	0,10

Rys. 1. Zależność przyrostu stosunku masy macicy do masy ciała myszy od udziału ekstraktu z koniczyny czerwonej w diecie

Fig. 1. The increase in the ratio of mouse uterine weight to body weight depending on the amount of clover extract in the diet

Tabela 5 — Table 5

Porównanie własności estrogennych i wartości żywieniowej pięciu gatunków koniczyny
Comparison of the estrogenic properties and nutrient value of five species of clover

Gatunek Species	Stosunek masy macicy do masy całego ciała × 10 ³ Ratio of uterus mass to body mas × 10 ³	Spożycie diety przez 10 dni w g na 1 mysz Diet consumption for 10 days per mouse (g)	Przyrost masy ciała w g na 1 g spożytej paszy Body mass gain (in grams) per g of consumption
Kontrola* Control	0,880	59,75 ^a	0,074
Koniczyna czerwona Red clover	3.413 ^a	42,13	0,043 ^b
Koniczyna biała White clover	0,770	46,38	0,082
Koniczyna perska Persian clover	0,985	44,00	0,062
Koniczyna szwedzka Alsike clover	0,671	46,88	0,071
Inkarnatka Crimson clover	0,869	44,88	0,068

Równoważnik ilości koniczyny w diecie 0,3 — equivalent amount of clover in diet 0,3.

*Pasza standardowa bez dodatku ekstraktu z koniczyny.

Standard feed without added clover extract.

Średnie różniące się od pozostałych średnich obiektywnych na poziomie istotności: a — 0,01, b — 0,10.

Average difference in remaining objects at significance level: a — 0.01, b — 0.10.

Rys. 2. Zależność przyrostu masy ciała myszy od udziału ekstraktu z koniczyny czerwonej w diecie

Fig. 2. The increase in mouse body weight as a function of the amount of red clover extract in the diet

DYSKUSJA

W suszu wszystkich analizowanych koniczyn stwierdziliśmy obecność izoflawonów zarówno w stanie wolnym, jak też związanych, prawdopodobnie glikozydowo. Prace niektórych autorów podają wprawdzie, że w koniczynie czerwonej i podziemnej izoflawony występują niemal wyłącznie (Beck, 1964), lub nawet wyłącznie (Beck i Knax, 1971), w formie glikozydów. Inne publikacje (Francis i Millington, 1965; Dedio i Clark, 1968; Jones, 1979), wykazują, że podczas suszenia ściętych roślin zachodzi częściowo hydroliza glikozydów pod wpływem enzymów zawartych w roślinie. Nadal jednak pozostaje kwestią dyskusyjną, w jakiej temperaturze enzymy te ulegają dezaktywacji. Problem ten jest szczególnie ważny przy konserwacji materiału roślinnego dla oznaczeń ilościowych, gdyż izoflawony oznacza się jedynie w formie nie związanej, po uprzedniej, przeważnie autoenzymatycznej hydrolizie. Zwykle w celu przeprowadzenia hydrolizy autoenzymatycznej materiał roślinny świeży, zamrożony lub wysuszony rozciera się lub miesza z wodą i pozostawia na określony czas w temperaturze pokojowej. Beck (1964) jednakże uzyskiwał zadowalające wyniki hydrolizy autoenzymatycznej tylko w przypadku świeżego materiału roślinnego. Dedio i Clark (1969) utrzymują natomiast, że suszenie do 80°C nie powoduje dezaktywacji enzymów i nie obniża zawartości izoflawonów. Autorzy ci zauważyli jednak znaczny spadek zawartości izoflawonów w przypadku, gdy materiał roślinny

suszony był powyżej 90°C i sugerują, że przyczyną tego mógł być rozkład izoflawonów. Jones (1979) badał wpływ różnych temperatur suszenia na zawartość formononetyny w koniczynie czerwonej dodając przy hydrolizie glukozydazę. Autor konkluduje, że temperatura w zakresie 60-80°C nie obniża zawartości formononetyny, a suszenie surowca nawet w temperaturze 105°C nie powoduje rozkładu tego izoflawonu, a jedynie dezaktywuje układ enzymatyczny. W naszym przypadku, kiedy materiał roślinny był suszony w 60°C, nie stwierdziliśmy po autoenzymatycznej hydrolizie obecności izoflawonów związanych glikozydowo. Ten więc sposób hydrolizy stosowaliśmy w oznaczeniach ilościowych.

Porównując zawartość izoflawonów w gatunkach koniczyny uprawianych w kraju stwierdziliśmy wysoką ich koncentrację (1,57‰ s.m.) tylko w koniczynie czerwonej. Ogólna zawartość izoflawonów w pozostałych gatunkach koniczyny nie przekraczała 0,1‰ s.m. Dominującymi izoflawonami koniczyny czerwonej były biochanina A (0,8‰) i formononetyna (0,7‰). Genisteina stanowiła zaledwie 0,07‰. Uzyskane dane nie odbiegają zasadniczo od innych doniesień. Dedio i Clark (1968) analizowali 16 odmian koniczyny czerwonej na zawartość głównych izoflawonów. W liściach analizowanych odmian zawartość biochaniny A wahała się od 0,60 do 1,12‰, a formononetyny od 0,35 do 0,94‰ s.m. W czterech odmianach testowanych przez Francis i in. (1967) biochanina A stanowiła 0,95 do 1,20‰, a formononetyna 1,00 do 1,20‰ s.m. Sachse (1974) porównał pod względem zawartości izoflawonów 20 odmian koniczyny czerwonej. W częściach nadziemnych analizowanych odmian zawartość biochaniny A wahała się w granicach od 0,15 do 0,48‰, a formononetyny od 0,18 do 0,98‰ s.m. Ponadto autor określił zawartość genisteiny, daidzeiny i pratenseiny. Zawartość tych izoflawonów była stosunkowo niska i stanowiła setne części procenta dla poszczególnych komponentów.

W literaturze światowej jest stosunkowo niewiele danych na temat izoflawonów w innych gatunkach poza koniczyną czerwoną i podziemną. Wiąże się to zapewne z niską aktywnością estrogenną pozostałych uprawnych gatunków. Francis i in. (1967) badali ponad 100 gatunków koniczyny na zawartość estrogennych izoflawonów. Dużą koncentrację izoflawonów stwierdzili zaledwie w 17 gatunkach. W pozostałych gatunkach ogólna zawartość izoflawonów nie przekraczała 0,25‰. Gatunki te autorzy określili jako nieestrogenne. Żaden z gatunków uprawianych u nas w kraju, poza koniczyną czerwoną, nie został przez wyżej cytowanych autorów zaliczony do koniczyn estrogennych, co jest również zgodne z naszymi wynikami. Autorzy podają jedynie, że koniczyna biała, obok innych paru gatunków, zawierała kumestrol w ilości 12 ppm. W analizowanej przez nas koniczynie białej odm. Radzikowska, jak też w innych badanych gatunkach koniczyny nie stwierdziliśmy obecności kumestrolu. Sachse (1974) analizując 32 odmiany koniczyny białej stwierdził znikome ilości kumestrolu w 15 przypadkach. Pozostałe

odmiany, łącznie z polską odmianą Podkowa nie zawierały kumestrolu. Spośród innych izoflawonów autor stwierdził w odmianach koniczyzny białej tylko formononetynę, której zawartość kształtowała się od 0,028 do 0,092‰ s.m.

Według danych z literatury izoflawony wykazują aktywność fizjologiczną analogiczną do działania żeńskich hormonów płciowych, estrogenów. Wprowadzone do organizmu zwierzęcego roślinne substancje estrogenne zakłócają równowagę hormonalną powodując między innymi zmiany przerostowe macicy. Ilościowa ocena tych zmian oparta na pomiarze stosunku masy macicy do masy ciała zwierząt doświadczalnych jest podstawą testów określających aktywność estrogeną (Pieterse i Andrews, 1956). Przeprowadzone przez nas doświadczenia żywieniowe na myszach wykazały wysoką aktywność estrogeną ekstraktów z koniczyzny czerwonej (tab. 5), związaną, jak można sądzić na podstawie analiz chemicznych i danych z literatury, z wysoką zawartością izoflawonów, a przede wszystkim biochaniny A i formononetyny (tab. 4). Wraz ze wzrostem równoważnika ilości koniczyzny czerwonej w diecie wzrastał wskaźnik aktywności estrogennej (rys. 1). U myszy karmionych paszą o aktywności estrogennej, takiej jaką ma susz koniczyzny czerwonej, stosunek masy macicy do masy ciała był około pięciokrotnie wyższy niż u myszy karmionych paszą kontrolną. Porównanie pięciu gatunków koniczyzny wykazało, że koniczyzna biała, koniczyzna szwedzka, inkarnatka i koniczyzna perska nie mają właściwości estrogennych. Jest to zgodne z wynikami analiz chemicznych i danymi z literatury (Francis i in., 1967; Sachse, 1974).

W przypadku wszystkich badanych gatunków koniczyzny dodatek ekstraktu z roślin do diety standardowej powodował spadek spożycia paszy w granicach 20 do 30‰. Francis (1973) sugeruje, że zawartość glikozydów izoflawonów wpływa ujemnie na wartości smakowe *T. subterraneum* dla owiec. W naszym doświadczeniu jednak spadek spożycia paszy nie jest skorelowany z oznaczoną chromatograficznie zawartością izoflawonów ani z aktywnością estrogeną.

Obserwowano również zahamowanie przyrostu masy ciała myszy karmionych paszą z dodatkiem ekstraktów z koniczyzny czerwonej. Działanie to ujawniło się szczególnie silnie w przypadku wzrostu udziału koniczyzny w diecie (rys. 2). Ekstrakt z koniczyzny czerwonej zawiera więc prawdopodobnie jakąś niezidentyfikowaną substancję antyżywniową. Należy nadmienić, że badacze francuscy zaobserwowali również hamujący wpływ preparatów białkowych z koniczyzny czerwonej na wzrost kurcząt (Guy — informacja prywatna). Podejrzewa się, że za właściwości antyżywniowe tych preparatów mogą być odpowiedzialne bliżej nie określone polifenole. Obecny stan wiedzy nie pozwala na jednoznaczne rozstrzygnięcie czy izoflawony lub ich glikozydy mają właściwości przeciwwzrostowe. Johnston i in. (1965) wykazali zwiększenie przyrostów masy ciała jagniąt płci męskiej, w przypadku gdy

dieta zawierała ekstrakty z lucerny bogate w estrogeny kumestrol. Kumestrol jest pod względem budowy chemicznej zbliżony do izoflawonów i powoduje podobne efekty estrogenne, jednakże w literaturze brak jest danych na temat aktywności wzrostowej izoflawonów.

Biorąc pod uwagę dużą rolę koniczyny czerwonej w żywieniu zwierząt, jak też obecność w jej składzie substancji antyżywniowych, wydaje się celowe prowadzenie dalszych badań w kierunku bliższego poznania składu chemicznego krajowych odmian koniczyny czerwonej oraz wpływu substancji swoistych na fizjologię zwierząt.

STRESZCZENIE

Przeprowadzono wstępne badania nad występowaniem izoflawonoidów – związków o działaniu estrogenym w pięciu uprawianych w Polsce gatunkach koniczyny: *Trifolium pratense* L., *T. repens* L., *T. incarnatum* L., *T. resupinatum* L. i *T. hybridum* L. Tylko w zielonych częściach nadziemnych koniczyny czerwonej stwierdzono duże ilości izoflawonów: biochaniny A (0,8% w s.m.), formononetyny (0,7% w s.m.) oraz niewielkie ilości genisteiny. W pozostałych gatunkach stwierdzono tylko niewielkie ilości formononetyny i genisteiny. We wszystkich gatunkach koniczyny stwierdzono obecność wolnych izoflawonów (aglikonów) jak i glikozydowo związanych. Doświadczenia laboratoryjne na myszach wykazały, że tylko koniczyna czerwona charakteryzuje się wysoką aktywnością estrogeną. Koniczyna czerwona zawierała również jakiś inny nie zidentyfikowany składnik zmniejszający przyrosty wagowe myszy.

LITERATURA

- Beck A. B. 1964. The oestrogenic isoflavones of subterranean clover. *Aust. J. Agric. Res.* 15: 223-230.
- Beck A. B., Knax J. R. 1971. The acylated isoflavone glycosides from subterranean clover and red clover. *Aust. J. Chem.* 24: 1509-1518.
- Bennetts H. W., Underwood C. J., Shier F. L. 1946. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. *Aust. Vet. J.* 22: 2-12.
- Dedio W., Clark K. W. 1968. Biochanin A and formononetin content in red clover varieties at several maturity stages. *Can. J. Plant Sci.* 48: 175-181.
- Dedio W., Clark K. W., 1969. Effects of sample preparation methods on the isoflavones of red clover. *Can. J. Plant Sci.* 49: 185-188.
- Francis C. M., Millington A. J. 1965. Variation in the isoflavone content of subterranean clover: Its estimation by a microtechnique. *Aust. J. Agric. Res.* 16: 557-564.
- Francis C. M., Millington A. J., Bailey E. T., 1967. The distribution of oestrogenic isoflavones in the genus *Trifolium*. *Aust. J. Agric. Res.* 18: 47-54.
- Francis C. M. 1973. The influence of isoflavone glycosides on the taste of subterranean clover leaves. *J. Sci. Food. Agric.* 24: 1235-1240.
- Gosden A. F., Jones R. 1978. A routine method for predicting the formononetin content of red clover. *J. Sci. Food Agric.* 29: 925-929.
- Johnston K. W., Angliemier A. F., Fox C. W., Oldfield F. E., Sather L. A., 1965. *J. Anim. Sci.* 24: 718-721.
- Jones R. 1979. The destruction of β -glucosidase activity by oven drying and its effect on formononetin estimation in Red Clover. *J. Sci. Food Agric.* 30: 243-245.

- Liener J. E. 1969. Toxic constituents of plant foodstuffs. Academic Press, New York — London, ss. 169-210.
- Pieterse P. J. S., Andrews F. N. 1956. The estrogenic activity of alfalfa and other feedstuffs. J. Anim. Sci., 15: 25-36.
- Sachse J. 1974. Die Bestimmung östrogener Isoflavone und Cumöstrol in Klee (*Trifolium pratense* L. und *Trifolium repens* L.). J. Chromatogr. 96: 123-136.
- Wong E. 1975. The isoflavonoids. [W:] The flavonoids. J. B. Harborne, T. J. Mabry, H. Mabry (red.), Chapman and Hall, London, ss. 743-800.